

PRODUCTION OF D **33 HYDROXYBUTYRIC ACID**

Patent number:	JP53018794 (A)	Also published as:	
Publication date:	1978-02-21		NL7708633 (A)
Inventor(s):	ROBAATO EMU RAFUATEI		US4211846 (A)
Applicant(s):	AGROFERM AG		SE7708845 (A)
Classification:			IT1116790 (B)
- international:	C12P7/52; C07C59/01; C12P7/42; C12P7/62; C07C59/00; C12P7/40; C12P7/62; (IPC1-7): C12D1/02		GB1542028 (A)
- european:	C07C59/01; C12P7/42; C12P7/62		more >>
Application number:	JP19770094061 19770804		
Priority number(s):	CH19760009957 19760804; CH19760010010 19760805		

Abstract not available for **JP 53018794 (A)**

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

Abstract of US 4211846 (A) The invention relates to a process of manufacturing D(-)-3-hydroxybutyric acid by breeding microorganisms capable of producing said acid in a nutrient medium containing certain specific carbon source; bacterial strains especially suitable in carrying out the process; an application of the process for obtaining such microorganisms; and uses of thus produced acid.

①日本国特許庁
公開特許公報

①特許出願公開
昭53—18794

①Int. Cl.²
C 12 D 1/02

識別記号

②日本分類
36(2) D 24

庁内整理番号
7110—49

④公開 昭和53年(1978)2月21日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 11 頁)

④D (—) —3—ヒドロキシ酪酸の製法

②特 願 昭52—94061

②出 願 昭52(1977)8月4日

優先権主張 ②1976年8月4日③スイス国①

9957/76

②1976年8月5日③スイス国①

10010/76

⑦発 明 者 ロバート・エム・ラファティ
オーストリー国グラズ・アレ
ハイリゲンベック4番

⑦出 願 人 アグロフェルム・アクチエンゲ
ゼルシャフト
スイス国クウル(番地の表示な
し)

⑦代 理 人 弁理士 青山葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

D (—) —3—ヒドロキシ酪酸の製法

2. 特許請求の範囲

1. 下記の条件で30時間培養した場合D (—) —3—ヒドロキシ酪酸を培養基1ℓ当たり少くとも100mg産生することのできる微生物を、炭素源として二酸化炭素、グルコース、フルクトース、サツカロース、ラクトース、糖蜜および乳漿の群からの同化しうる炭水化物、メタノール、エタノールおよびグリセリンの群からの同化しうるアルコールまたはカプロラクタム合成の廃液ならびに同化しうる窒素および痕跡の元素を含有する水性培養基に約25～40℃でpH値約4～8で培養し、生成したD (—) —3—ヒドロキシ酪酸を培養液から単離することを特徴とするD (—) —3—ヒドロキシ酪酸の製法。

2. D (—) —3—ヒドロキシ酪酸を産生する微生物としてアルカリゲネス・ユートロフスATCC 23440からの変異菌株たとえばCBS 381.76、

アゾトバクター・クロオコツカムDSM 281からの変異菌株たとえばCBS 383.76、バチルス・メガテリウムATCC 32からの変異菌株たとえばCBS 382.76、ゾオグレア・ラミゲラATCC 19623からの変異菌株たとえばCBS 384.76、クロストリジウム・ブチリクムATCC 19398からの変異菌株CBS 380.76またはミコプラナ・ルブラCBS 385.76およびその相当する変異菌株を用いることを特徴とする前記第1項記載の製法。

3. 培養液の炭素源の含量が約2～25%グルコース、フルクトース、サツカロース、ラクトース、糖または乳漿(純粋な炭水化物として計算して)、約1～10%メタノール、エタノールまたはグリセリンまたは1～10%カプロラクタム合成の廃液(その中に含有するカルボン酸の総量として計算して)であることを特徴とする前記第1項記載の製法。

4. 用いる微生物が好気性であるか嫌気性であるかによつて培養を好気または嫌気条件下で行う

ことを特徴とする前記第1項、第2項または第3項記載の製法。

5. アルカリゲネス・ユートロフス ATCC 23440 からの変異菌株たとえば CBS 381.76、アゾトバクター・クロオコツカム DSM 281 からの変異菌株たとえば CBS 383.76、バチルス・メガテリウム ATCC 32 からの変異菌株たとえば CBS 382.76、ゾオグレーア・ラミゲラ ATCC 19623 からの変異菌株たとえば CBS 384.76、クロストリジウム・ブチリクム ATCC 19398 からの変異菌株たとえば CBS 380.76 またはミコプラナ・ルブラ CBS 385.76 およびその相当する変異菌株からなる前記第1項～第4項記載の製法を行う D(-)-3-ヒドロキシ酪酸産生変異菌株。

6. 酪酸または D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を産生またはポリ- (D-3-ヒドロキシ酪酸) を貯蔵する微生物を変異誘発剤の作用に付し、かくして得られた変異菌株から D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を同化し得ない菌株を選択し、必要に応じて新

しく変異誘発剤を作用させた後、かくして選択された変異菌株から前記炭素源および前記培養条件で使用した場合培養基 1 l 当たり少くとも 100 mg の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を 30 時間以内に生産する菌株を再び選択することを特徴とする、できるだけ短時間に供給した炭素源の最高割合を D(-)-3-ヒドロキシ酪酸に変換しうる微生物を得る前記第1項～第4項記載の製法の使用。

7. 前記第1項～第4項記載の製法によつて製造された D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の非経口栄養への使用。

8. D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を必要に応じ置換された低級アルカノールでエステル化することを中心とする前記第1項～第4項記載の製法によつて製造された D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のその光学的に活性なエステルの製造への使用。

9. エステル化に炭素数 1～5 のアルコールを使用することを特徴とする前記第8項記載の使用。

10. D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を過剰のアルコール中、強鉱酸の存在下にエステル化を行うこと

を特徴とする前記第8項または第9項記載の使用。

11. アゾトバクター科、バチルス科、シュードモナス科、メタノモナス科、スピリルス科、アクロモバクター科およびエンテロバクター科に属する D(-)-3-ヒドロキシ酪酸生産菌を培養し、その培養物から D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を採取することを特徴とする D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は D(-)-3-ヒドロキシ酪酸産生微生物を培養することによる上記酸の製造法、更に特に適当な微生物によるその方法の実施およびそのような微生物を得るための方法の適用ならびにその方法の生成物の利用に関する。

文献には光学活性 3-ヒドロキシ酪酸の表示に相反する教示が提出されているが、本発明では次の定義を重んずる。

天然に生ずる、あるいは生理学的な 3-ヒドロキシ酪酸または D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (あるいは D(-)- β -ヒドロキシ酪酸) は水 100 ml 当たり 5 g の濃度で比旋光度 $[\alpha]_D^{25} - 24.5^\circ$ を有するが、一方、天然に生じない 3-ヒドロキシ酪酸または L(+)-3-ヒドロキシ酪酸は水 100 ml 当たり 2.226 g の濃度で比旋光度 $[\alpha]_D^{10} + 24.3^\circ$ を有する。

以下特記しない限りナトリウム D 線でマイナスの 3-ヒドロキシ酪酸を意味するものとし、これを略して β -HB で表わす。

ラセミのDL-3-ヒドロキシ酪酸の製造については種々の方法が開示されている：なかんずくドイツ特許公開公報441003およびビスリセウス(Wislizeus)、アンナーレン・デル・ヘミイ(Ann.)第149巻(1869年)、207頁参照。マツクケンチイ(Mc Kenzie)およびハーデン(Harden)はまた黒色麹菌(*Aspergillus niger*)を用いてDL-3-ヒドロキシ酪酸から光学的に吾性な純粋なL(+)-3-ヒドロキシ酪酸の製造に成功している〔ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサイエティ(J. Chem. Soc.)、第83巻(1903年)、430頁〕。

D(-)-3-ヒドロキシ酪酸はヒト、動物、植物および微生物(すなわちバクテリア、酵母、真菌類および藻類)に、すなわち脂肪代謝における必須物質として生ずる〔エドシュトルム(Edström)ら、Acta Obstet. Gynecol. Scand. 第54巻(1975年)、347頁；ムーア(Moore)らアメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジ

イ(Am. J. Physiol.)第230巻(1976年)、619頁〕。この天然発生および生理学的機能のために、化合物に大きい意義なかんずく非経口的栄養においてまたヒトの有機体と良く適合する化合物の製造における成分として大きな意義が付される。

しかしながらラセミおよび右旋性の天然に生じない3-ヒドロキシ酪酸に明らかにされた関係に対して-今日までD(-)-3-ヒドロキシ酪酸を製造する技術的に実施しうる方法がなお開示されていないことは驚くべきことである。特にこれまで所望のカルボン酸を生成しうる微生物は見出されていない。

驚くべきことに本発明者は非常に安価な炭素源から出発して高濃度のD(-)-3-ヒドロキシ酪酸(今後 β -HBで示す)を産生し、そしてこの能力は常に改良させうる微生物を得ることができることを見出した。

特に出発点として適当なのは、たとえばアゾトバクター科(Azotobacteraceae)、バチル

ス科(Bacillaceae)、シユードモナス科(Pseudomonadaceae)、メタノモナス科(Methanomonadaceae)、スピリルス科(Spirillaceae)、アクロモバクター科(Achromobacteraceae)およびエンテロバクター科(Enterobacteraceae)のメンバーのようなそれ自身酪酸またはポリー(D-3-ヒドロキシ酪酸)を合成しうる微生物である。

たとえばアルカリゲネス・ユートロフス(*Alcaligenes eutrophus*)ATCC 23440、窒素菌(*Azotobacter Chroococcum*)DSM 281、巨大菌(*Bacillus megatherium*)ATCC 32、ゾオグレア・ラミゲラ(*Zoogloea ramigera*)ATCC 19623および空気から単離されたメタノール利用ミコプラナ・ルブラ(*Mycoplasma rubra*)のような既知のポリー(D-3-ヒドロキシ酪酸)を蓄積する微生物は、たとえば唯一の炭素源としてフルクトースで、できるだけ少くポリー(D-3-ヒドロキシ酪酸)を蓄積するように深部条件下に培

養される。このような条件は培養基中の小さいC/N割合および/または高い酸素分圧である。炭素源を除去した後、微生物を唯一の炭素源としてラセミまたはD(-)-3-ヒドロキシ酪酸、および活性なまたは生育している細胞を破壊する抗生物質を含有する培養基に入れる。酵素3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(=EC 1.1.1.30；イー・ティ・バルマン(E. T. Barman)著エンティム・ハンドブック(Enzym Handbook)、スプリングルーフエアラーク(Springer-Verlag)、ベルリン1969年参照)を生成しない従つて β -HBを同化することのできない潜伏または生育しない細胞を単離し、その β -HB生成能を試験する。この目的には、 β -HB濃度をウィリアムソン(Williamson)およびメランビー(Mellanby)の共著〔メソツズ・オブ・エンチマティック・アナリシス(Methods of Enzymatic Analysis)、フエアラーク・ヘミー社(Verlag Chemie GmbH)、グアインハイム(Weinheim)およびアカデミ

ック・プレス社 (Academic Press Inc.)、
 ニューヨーク 1974 年、1883 頁) の酵素方
 法によつて微生物を含有する培養基の試験量を定
 量的に測定する。このようにして得られた β -HB
 を生成し、 β -HB を産生する微生物を培養基の
 単位容量当り、出発菌株よりも β -HB の更に高
 濃度を産生する変異菌株を選択するために、既知
 の変異誘発剤で (たとえば紫外線、 NaNO_2 、ニト
 ローニトロソ-メチルグアニジンなどで; たとえ
 ばアール・シー・クロウス (R. C. Clowes) 共著 2
 およびダブリユウ・ヘイズ (W. Hayes) 共著 2
 ベリメンツ・イン・マイクロバイアル・ゼネティ
 ックス (Experiments in Microbial Gene
 tics)、ブラックウェル・サイエンティフィック
 ・パブリケーションズ (Blackwell Scientific
 Publications)、オックスフォードおよびエ
 ジンバラ 1968 年参照) 処理する。

このようにして選択された変異菌株の D(-)-3
 -ヒドロキシ酪酸産生能をなお更に増大させるた
 めに、更に変異させ、生じた変異菌株から D(-)-

産生性の増加した子孫株を得るために前述の変異
 方法に付す。

酪酸または D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を産生し
 またはポリ- (D-3-ヒドロキシ酪酸) を蓄積
 する微生物を変異誘発剤の作用に付し、かくして
 得られた D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を同化する能
 力のない変異菌株から選択し、これから必要に
 応じ更に変異誘発剤を作用させた後一次に選ば
 れた炭素源および生育条件を用いた場合、変異さ
 れた出発菌株よりもより多くの D(-)-3-ヒドロキ
 シ酪酸を産生するものを再び選択することによつ
 て、できるだけ短時間に供給した炭素源の最高の
 割合を D(-)-3-ヒドロキシ酪酸に変換する微生
 物が本発明により得られる。

β -HB 産生微生物は後に既知の方法によつて
 慣らされ、特殊な炭素源すなわち二酸化炭素、グ
 ルコース、フルクトース、サツカロース、ラク
 トース、糖蜜または乳漿のような同化しうる炭水化
 物、メタノール、エタノールまたはグリセリンの
 ような同化しうるアルコールまたはカプロラクタ

3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性のみな
 らず、トリカルボン酸サイクルの1つまたはそれ
 以上の活性の欠乏および抑制を示すものを選択す
 ることができる (バルマンの上記引用文中参照)。

他方クロストリジウム属 (*Clostridium*)
 たとえば酪酸菌 (*Clostridium butyricum*)
 ATCC 19398 のようなポリ- (D-3-ヒ
 ドロキシ酪酸) を蓄積せず、酪酸を生成する微生
 物から同様な方法で、3-ヒドロキシ酪酸デヒド
 ロゲナーゼを少しも生成せず、その結果 β -HB
 を同化することのできない子孫株が選択される。
 このような菌株は寒天平板上に散在したコロニー
 として生育させる。生育が行われた後、寒天表面
 に 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、酸化さ
 れた形のニコチン-アデニン-ジヌクレオチド (NAD)
 およびメチレンブルーまたはトリフェニ
 ルテトラゾリウムクロリドからなる酸化還元指示
 薬の混合物を塗布する。次いで酸化還元指示薬の
 変色を起こさせるコロニーを調べる。これらを単
 離し、その β -HB 産生能を試験する。 β -HB

ム合成の廃液の高濃度中で生育し β -HB を産生
 し、その際 NH_4 イオンまたは尿素が窒素源とし
 て用いられ、普通の痕跡の元素が加えられる。ア
 ルカリゲネス・ユートロフス ATCC 23440
 の子孫株は上記のような有機炭素源に加えて β -
 HB を産生するために、同時に水素分子および酸
 素を含有する雰囲気の場合は二酸化炭素をも同化
 する。

この方法で特に産生量の多い D(-)-3-ヒド
 ロキシ酪酸産生変異菌株の源は、アルカリゲネス・
 ユートロフス ATCC 23440 からのもの、た
 とえば変異菌株 CBS 381.76、窒素菌 DSM
 281 からのもの、たとえば変異菌株 CBS 383.
 76、巨大菌 ATCC 32 からのもの、たとえば
 変異菌株 CBS 382.76、ゾーオグレーア・ラ
 ミゲラ ATCC 19623 からのもの、たとえば
 変異菌株 CBS 384.76、酪酸菌 ATCC 19
 398 からのもの、たとえば変異菌株 CBS 380.
 76 および更にミコプラナ・ルブラ CBS 385.
 76 およびそれに相応した得られた変異菌株であ

る。

もちろん、上記方法の使用に選んだ微生物はその産生性をなお改良することができる。上記の菌株はアメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション (American Type Culture Collection (ATCC))、12301パークローン・ドライブ (Parklawn Drive)、ロックビル (Rockville) メリイランド (Maryland)、米国；セントラル・ビュウロウ・フオール・シンメルクルツウル (Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS))、オーステルシュトラート (Oosterstraat) 1、バールン (Baarn)、オランダ国；ドイツエ・ザムルンク・フュール・ミクロオルガニズメン (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM))、ミュンヘン (München)、ドイツ連邦共和国に寄託されている。

大規模な D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の製造において高収量を得ることを確実にするためには、次に示す条件下で生育期間 30 時間生育させた場合

述の濃度の炭素源と同化し得る窒素源ならびに必須の痕跡の元素の水性培養液を用意する。滅菌培養基は 0.1~10 容量%の予備培養を接種し、約 25~40℃ で静置培養または嫌気性微生物たとえばクロストリジウム (Clostridium) 種に対しては空気を除いて、あるいは攪拌または振盪し、好気性微生物に対しては必要に応じて空気または二酸化炭素、水素および酸素（または空気）の混合物を供給して 8~72 時間培養する。所望の D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のできるだけ高い収量を得るために、滅菌アルカリ溶液を加えて接種溶液 pH 値を 4~8 に保つ。生物塊の生育の間、一定の濃度に保つために、絶えず新しい炭素源を加えてもよく、 β -HB の最高の産生を達成する。

本発明方法は本質的に D(-)-3-ヒドロキシ酪酸産生微生物を、炭素源として CO_2 、グルコース、フルクトース、サツカロース、ラクトース、糖蜜および乳漿の群からの同化しうる炭水化物、メタノール、エタノールおよびグリセリンの群からの同化しうるアルコールまたはカプロラクタム

少なくとも培養基 ℓ 当たり ~~少くとも~~ 酸 100 ㍉を産生することのできる微生物を使用しなければならない。しかしながら、その β -HB の産生が同じ生育条件で 30 時間で少なくとも培養基 ℓ 当たり ~~少くとも~~ も 200 ㍉となる微生物を使用する場合、経済的であり、この方法の変化は本発明のすぐれた実施形態である。特に少なくとも 500 ㍉/ ℓ 培養液または 1 g/ ℓ 培養液の β -HB 産生 (30 時間) を有する微生物は同様な理由で特別にすぐれている。

培養液中の炭素源の含量は約 2~25% グルコース、フルクトース、サツカロース、ラクトース、糖蜜または乳漿（純粋な炭水化物として計算して）、約 1~10% メタノール、エタノールまたはグリセリンまたは約 1~10% のカプロラクタム合成の廃液（その中に含有するカルボン酸の総量として計算して）である。

得られたすべての微生物は固体の培養基上に β -HB を産生するが、実際的な理由から液体培養基での産生が好ましい。それには既知の方法で前

合成の廃液ならびに同化しうる窒素源および痕跡の元素を含有する水性培養基中で、約 25~40℃ の温度で、pH 値が約 4~8 で培養し、生成した光学的に活性な D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を培養液から既知の方法で単離することに存する。

発酵が終わってから、すなわち β -HB 濃度が最高に達したとき、 β -HB を、必要に応じて発酵液から生物塊を分離した後または発酵溶液をたとえばエーテル、クロロホルムまたは他のクロロ化された炭化水素、酢酸エチルまたは他のエステル、イソプロパノール、ブタノールおよび他のアルコールのような水と混合しない溶媒で約 pH 1.5~2.5 の酸性にした後、イオン交換樹脂で抽出することができる。 β -HB は有機溶液から、たとえばリチウム、カリウム、ナトリウム、カルシウム、バリウム、ニッケルまたは亜鉛のような金属陽イオンで塩として沈殿させることができ、または濃水溶液に変えてもよい。

D(-)-3-ヒドロキシ酪酸は特に非経口栄養に用いることができ、その際これはこれに関して脂

肪と実質的に同等であるので、これまでカロリー供給に用いた脂肪成分の一部または全部に置き代えることができる。しかしながら、それに加えて脂肪と比較して先の鹼化にも繰返されたβ-酸化をも必要としない中間代謝に直接利用できる利点がある。

周知のように果実および植物中のにおいのする物質および芳香物質は、一部D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の低級アルキルエステルからなる。しかしその合成的製造は、技術的に実施できる経済的な製造方法によつて純粋な状態でD(-)-3-ヒドロキシ酪酸を製造することが不可能なことでこれまで苦しんでいた。特に、所望のカルボン酸を産生する微生物がこれまで知られていなかった。

本発明方法は非常に安価な炭素源から高収量で純粋なD(-)-3-ヒドロキシ酪酸を製造することができ、前述の光学的に活性なエステルの合成の可能性をもたらした。

この方法によつて製造されたD(-)-3-ヒドロキシ酪酸は必要に応じ置換された低級アルコール

で既知の方法によつてエステル化される。たとえばエステル化はカルボン酸を過剰のアルコール中で、強酸たとえば硫酸の存在下で処理することにより行われる。アルコールとしては特に炭素原子1~5のものが用いられる。

かくして得られたエステルは果実および植物に生ずる、においのある物質および芳香物質と同じ配置を示す。これまでラセミのDL-3-ヒドロキシ酪酸を用いて製造していた果実芳香物質に対して、D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のエステルは、毒物学的に危険がなく、重量基準で嗅覚的および官能的性質が非常に増大されたその「天然の」配置である長所を有する。

このようにして製造されたエステルは、においのある物質および芳香物質として食品および香料に使用することができる。

次に実施例を挙げて本発明を説明する。

実施例 1

0.9% $\text{Na}_2\text{HSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.15% KH_2PO_4 、0.1% NH_4Cl 、0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.0195

%クエン酸鉄(Ⅲ)アンモニウム・ $6\text{H}_2\text{O}$ 、0.00133% CaCl_2 および溶液1ℓ当り、0.01% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.003% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.03% 硼酸、0.02% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.001% $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.002% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.003% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の痕跡の元素溶液1mlを含有する培養液をまず用意する。250mlのエrlenマイヤーフラスコ中に培養液30mlずつ入れ、30℃で16~24時間振盪または静置培養する。121℃で20分間滅菌した溶液に、980ml当りフルクトース10gを含有する滅菌済みのフルクトース溶液20mlを加える。24時間の寒天斜面培養からループで接種する。

振盪培養は遠心分離して沈澱させ、生物塊を水洗し生理的食塩水約4mlに取る。約1時間後pH4.6の0.6N酢酸ナトリウム緩衝液と0.05N亜硝酸ナトリウム溶液4mlを必要に応じて加えて変異を発生させ、数分間培養する。洗浄後、各微生物(次の表を参照)の生物塊を約10個の250mlエrlenマイヤーフラスコに分け、それにフル

クトースの代りに2%DL-3-ヒドロキシ酪酸(または1%D(-)-3-ヒドロキシ酪酸)を含有する以外は前記と同じ培養基を加える。濁りがフラスコ中に増大するのが見えはじめた後、各菌によりフラスコ当りそれぞれ2~1000μg/ml K-ペニシリンの滅菌済過溶液1ml、30~1000μg/ml バシトラシンの滅菌済過溶液、10~2000μg フォスフォノマイシ/μlまたは5~1000μg バンコマイシン/μlの滅菌済過溶液またはこれらの溶液の組合せあるいはたとえば硫酸コリスチンのような細胞壁の生成または微生物の分裂に影響を与える他の抗生物質を加える。種々の培養期間後すなわち1~16時間後、抗生物質を洗い出すかペニシリナーゼで破壊する。更に生物塊を洗浄した後、生き残った微生物をフルクトース培地のフラスコ中に接種し培養する。

16~36時間後、各フラスコから通滅希釈し、ml当り約50~1000菌体を含有する希釈液から0.1mlをそれぞれ散在するコロニーを得るために寒天平板上に塗布する。この寒天は炭素源とし

て2% DL-3-ヒドロキシ酪酸ならびに唯一の炭素源として0.008%のフルクトースを含有する。約48時間後、非常に多数の直径約1/4〜1mmの種々の外観の小さなコロニーならびに正規の大きさのコロニーが生成した。すべての小さいコロニーの変形から滅菌した木のつまようじで接種物のいくつかを(DL)-3-ヒドロキシ酪酸ナトリウムが唯一の炭素源である寒天平板の一定の場所に、他をフルクトースまたはグリセリンが唯一の炭素源である寒天平板の相当した場所に移す。もはや β -HBを同化することができなく β -HBを産生する所望の菌株が、D(-)-3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼが無いが抑制するために3-ヒドロキシ酪酸上では生育することができないか不十分にしか生育しえない自然発生的に存在するか人工的に製造された変異菌株コロニー中から見出される。D(-)-3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ活性が無いが抑制することはD(-)-3-ヒドロキシ酪酸産生の実際的に用いる方法の必要条件である。

たとえば紫外線の照射のような他の変異誘発剤を使用することによつて、あるいは β -HBを捉えうる量産生する子孫株への偶発的な自然の変異菌株を単離することによつても同じ結果となる。

酪酸菌を用いる試験では、エイ・ジエイ・ショツヘル(A. J. Schocher) [「アイン・バイトラーク・ツウル・ケントニス・デル・バクスツウムズーウンツ・ゲールングスフィジオリギイ・デル・ザツカロリテイツセン・クロストリディーン」] (Ein Beitrag zur Kenntnis der Wachstums- und Gärungsphysiologie der Saccharolitischen Clostridien)、ディゼアタチオーン、ラボラトリウム・フオール・ミクロビオリギイ、テクニツシエ・ホツホシユウレ・デルフト(Dissertation, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hochschule Delft)(オランダ)、1959年]による厳密な嫌気状態で同様な方法で行われる。

これらの菌株は次のような構成および準備のミルクのように濁った石灰寒天上に接種される：適当な炭素源を有する前述の培養液を含有する厚さ約5mmの固まった寒天層に、純粋な沈降 CaCO_3 0.1%追加して含有する同じ滅菌培養液の層を、上層が約2mmとなるように覆う。

周囲の寒天領域がそのミルク様の濁りを失い、それ故周囲の寒天が透明になつたコロニーは酸を産生する。ウィリアムソンおよびメランビイ(上記引用文参照)の酵素法によつてその β -HB産生能を試験するために、このようなコロニーを適当な深部培地でこのようなコロニーを振盪培養した。良好な酸産生菌を寒天斜面培養からループでおのおの適当な炭素源(表参照)を含有する培養液(上記参照)100mlの入った500mlのエrlenmeyerフラスコ中に接種し、回転振盪器で135回転/分、30℃で培養した。30〜52時間後、サンプルを取り分析した。結果を次表に示す。

5字削除

同様な方法で、たとえばアルキル化合物または

β -HB-産生微生物の生産

種当たり約10,000菌株の設形成能力を検査した。

微 生 物	使 用 抗生物質	β -HB-産生微生物の数			最高の β -HB-生産菌株		炭 素 源
		1 μ /Lまで	10 μ /Lまで	95 μ /Lまで	μ /L 中	最良の菌株の名称	
アルカリゲネス・ユートロフス (<i>Alcaligenes eutrophus</i>) ATCC 23440 およびその変異菌	--- ペニシリン/ バシトラシン	O* 約 800	- 6	- 1	- 54	GA-3 (CBS 381.76)	フルクトース
巨大菌 (<i>Bacillus megatherium</i>) ATCC 32 およびその変異菌	--- ペニシリン	O* 約 600	- 15	- 2	- 65	GB-1 (CBS 382.76)	サツカロース
窒 素 菌 (<i>Azotobacter chroococcum</i>) DSM 281 およびその変異菌	--- ペニシリン	O* 約 700	- 7	- 3	- 39	GC-7 (CBS 383.76)	サツカロース
ゾオグレア・ラミゲラ (<i>Zoogloea ramigera</i>) ATCC 19623 およびその変異菌	--- フオスフォ マイシン	O* 約 100	- 2	- 0	- 6	GZ-1 (CBS 384.76)	サツカロース
酪 酸 菌 (<i>Clostridium butyricum</i>) ATCC 19398 およびその変異菌	--- バシトラシン/ ペニシリン	O* 約 1,100	- 3	- 1	- 76	GC1-2 (CBS 380.76)	サツカロース
ミコプラナ・ルブラ (<i>Mycoplasma rubra</i>) およびその変異菌	--- D-シクロセリン	O* 約 300	- 21	- 0	- 8	GM-1 (CBS 385.76)	グリセリンまたは メタノール

※) 平板試験でも酵素的にも検出できない。

実施例 2

β -HB 産生菌株 GA-3 および GB-1 を実施例 1 に記載した変異菌株選択方法に付し、同様に寒天平板上に塗布した。生育が終つた後、コロニーをピロードのスタンプで寒天が青色または紫色に着色する pH 指示薬としての量の滅菌プロモクレゾールグリーンまたはプロモクレゾールパーブルを含有する石灰寒天平板または新鮮な寒天平板上に塗布する。しばらく保温した後、すなわち 5~6 時間ばかり後、コロニーが急速に生育し、多くの酸を形成する場所に置かれる結果、pH 指示薬の変色が認められる。この手法によつて、このようなコロニーはその β -HB 産生性を見出すために選択され、深部状態で繁殖させられる。用いた β -HB 産生菌株の変異菌株のほとんどは β -HB の産生が少いか全く産生しない。しかしながら変異によつて得られた多くの変異菌株のうち少しは元の菌株よりも多くの β -HB を産生することが認められる。このような変異菌株は更に高い濃度の β -HB を産生することのできる菌株を

見出すために新しい変異/選択サイクルに付される。

選択された菌株は 135 rpm で水平に振動しているプレートに 45° の角度で結びつけられている滅菌培地 5 ml の入った振盪培養管 (直径 16 mm の試験管) 中で 30℃ で培養した。この方法で菌株アルカリゲネス・ユートロフス GA-3 (CBS 381.76) から 5% フルクトースで 51 時間に 95 μ g β -HB / ℓ を産生する培養を得ることができた。新しい変異/選択方法で同じ条件下で約 400 μ g β -HB / ℓ を産生する培養が得られた。

同様な方法で菌株巨大菌 GB-1 (CBS 382.76) から 54 時間以内にサツカロースで 145 μ g β -HB / ℓ を生成する振盪培養が得られた。新しい変異/選択方法で同じ条件下で 1 g β -HB / ℓ 以上を産生する振盪培養が得られた。

変異/選択方法を追加することにより更に β -HB の収量を増加することができた。

実施例 3

巨大菌株 GB-1 から選択した変異菌株 31N 21字挿入

をフルクトースの代りに ℓ 当りサツカロース24gおよびペプトン100mgを含有する実施例1の培養液2.5 ℓ の入った5 ℓ の小さな発酵器〔品種：ビオスタットV (Biostat V)、ブラウネルズンゲン (Braun-Melsungen)〕中で培養した。一夜振盪した同じ培地中の培養100mlを接種物として用いた。小さな発酵器は約0.5容量/容量・分で30℃に調節し600rpmで攪拌した。培養中pHを10%水酸化ナトリウム溶液を加えて7.2~7.3に保った。30分後発酵溶液は170mg β -HB / ℓ を含有した。生成物を上澄液からOH形のアンバーライト410Aに吸着させ、0.5N硫酸で溶離した。高濃度に濃縮した溶離液をピー・エイ・シャッフアー (P.A. Schaffer) およびダブリユウ・エム・マリOTT (W.M. Moriott) [ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリイ (J. Biol. Chem.)、第16巻、268頁 (1913年)] の抽出方法で処理し、その結果 β -HBのカルシウム-亜鉛混合塩330mgを単離することがで

変異菌株GC1-112を4%サツカロース、0.3%酢酸アンモニウム、0.178% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.136% KH_2PO_4 、0.042% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.00025% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.013% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ および1000ml当り1 μg (+)-ビチオンを含有する培地に48時間培養した後、発酵培地は171mg β -HB / ℓ の濃度であつた。

実施例7

メタノールを利用することのできる微生物を見出すために、500mlのビーカーに唯一の炭素源として1%メタノールを含有する以外は実施例1の培養液約100mlを入れた。二三日後培養は曇り、実施例1の培地の寒天平板上を水で適当に希釈するとそれから個々に散在するコロニーが産生された。選択されたコロニーから前記のグリセリン培地中で振盪培養を行ないロウ (Law) およびスレベツキイ (Slepecky) [ジャーナル・オブ・バクテリオロジイ (J. Bact.)、第82巻 (1961年)、33頁] に従つてポリ- β -

きた。エタノール/水から3回再結晶した後、層の厚さ20cmで生成物の溶液 (水100ml当り8.027g) は -2.60° のナトリウムD線の旋光度を与え、これは $[\alpha]_D^{20} = -16.2$ に相当し、文献と一致する結果であつた。

実施例4

実施例3と同様な方法で、サツカロースの代りにグルコースを含有する培地を用いた。カルシウム-亜鉛D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を単離することができた。

実施例5

実施例3と同様な方法で、サツカロースの代りにサツカロース含量51%のテンサイ糖蜜を ℓ 当り50gを含有する培地を用いた。得られた発酵溶液は31時間の培養後160mg β -HB / ℓ を含有した。

上記と同様な方法で、サツカロースを用いて同じ結果であつた。

実施例6

嫌気条件下で酪酸菌ATCC19398からの

ヒドロキシ酪酸を形成し、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・バクテリア (National Collection of Industrial Bacteria) [ミニストリイ・オブ・アグリカルチュア、フィツシャリイ・アンド・フード、トリイ・リサーチ・ステイション、アバーディーン、スコットランド (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Aberdeen, Scotland)] の管理者によつてミコプラナ・ルブラ菌株と確認されている。この菌株はセントラル・ビューロウ・フオア・シンメルカルチュアズ (Central Bureau for Schimmelcultures) にCBS385.76なる名称で登録され、最初にバクテリウム・イン・エジチオ・P1と命名された。これは次の特徴を有していた。

形態学 (1%グリセリン+1%ペプトンよりなるGP寒天上pH7で30℃で6日間)
多形態性の杆状菌 $0.8 \times 1.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 、細胞は

高濃度のポリ-β-ヒドロキシ酪酸を含有する。長い深部培養、すなわち7日以上のは位相差顕微鏡で検出し得る最初の細胞分枝を有する少量の細胞を含有する。

コロニー (GP寒天、30℃で6日間)

バラ色に着色、透明な、円形の、全体に縁があり、凸面に高まり、なめらかで光沢があり、直径は0.5~1.0mmである。着色は長くなると強くなる。血液寒天基 (オキシド (OXOID) CM 55) 上では発育は非常に乏しい。

深部発育 (1%グリセリン+1%ペプトンからなるGP培養液でpH 7.0で30℃で6日間)

かなり弱い発育、表面に環および膜を形成、少し軽い沈殿物。

温度:

10℃で少しかまたは発育しない。

15℃で発育。

30℃で発育。

37℃で発育しない。

変化まではグラム染色は陰性

可動性

コーヴアクス (Kovacs) のオキシダーゼ +
カタラーゼ +

フウ (Hugh) およびライフソン (Leifson)
(グルコース) OF -

ペプトン水炭水化物: グリセリンに酸形成。

グルコース、フルクトース、マルトース、サツ
カロース、ラクトース、澱粉またはマンニトール
に酸を形成しない。

インドール産生 -

メチルロート -

ホゲス-プロスカウエル (Voges-Proskauer) -

トリプトン 弱く NH_4^+ 形成

硝酸塩-還元 -

ウレアーゼ (クリステンセン (Christensen)) +

澱粉 弱く加水分解

ゼラチン 加水分解せず

カゼイン 加水分解せず

溶血現象

抗生物質感受性

1字挿入

ペニシリン、クロラムフェニコールおよびポリ
ミキシンBに耐性; ストレプトマイシンおよびテ
トラサイクリンに感受性。唯一の炭素源としてメ
タノールを利用しうがメタンはできない。

実施例 8

培地中のサツカロースを2.5%のメタノールに
代える以外は実施例3と同様な方法を空気から新
しく単離したメタノールを利用するマイコプラナ
・ルプラ菌株 (CBS 385.76) の子孫GM-3
7を用いて行つた。31℃で48時間培養後、発
酵液は36%β-HB / ℓを含有した。

実施例 9

アルカリゲネス・エートロフス菌株GA-3 (C
BS 381.76) から選択した変異株H-7を
、有機炭素源なしで、攪拌下に28℃で10%
CO₂、20%O₂ および70%H₂ を含有するガ
ス混合物を0.11容量/容量・分で通気し、10
%のNaOHを加えてpH値を7.1に保つて、実施
例1の培地で小さな発酵器中で実施例3と同様に
培養した。51時間後発酵液は30%β-HB /

ℓを含有した。

実施例 10

高いβ-HB生成性を有する菌株を見出し選択
するのに更に用いて成功した方法は、実施例1お
よび2で得られた細胞を、短い実験でそのβ-HB
生成速度を分析することであつた。この目的には
、30時間の長い振盪培養の細胞塊を遠心分離し
、生理的食塩水で洗浄し、適当な炭素源を有する
新鮮な培地に懸濁し、たとえば既知のバールブル
ク (Warburg) の呼吸装置中で培養した。高い
β-HB生成能を有する細胞懸濁液は高いO₂吸
収によつて区別された。このような懸濁液のβ-
HB生成速度は既知の酵素的分析によつて決定さ
れた。親菌株に比べて実質的に増加したβ-HB
生成能を有する菌株を、β-HB産生の純粋なク
ローンを得るため平板培養した。

このようにして、巨大菌GB-1からたとえば
毎分および細胞乾燥塊9当り糖蜜に1.5%β-HB
を産生する亜株 (たとえば変異菌株24N) を見
出すことができた。同じ試験方法で、たとえば巨

大菌株が pH 5 でその最大の β -HB 産生速度に達することを確立することができた。

実施例 11

更に観察してクエン酸サイクルにおいてその合成能力がじやまされた変異菌株は、その正規の親菌株よりも非常に大量の β -HB を生成することが認められた。たとえば巨大菌株 24 N を、前以て変異誘発剤で処理した後で実施例 1 の既知のペニシリン破壊方法で処理した。これらの変異菌株をクエン酸、コハク酸およびグルタミン酸を加えないで生育することのできないまた少ししか生育することのできないものを選択し豊富にした。このようにして培地に上記の有機酸の少量を加えて最適に生育しない 4 変異菌株コロニーを見出した。これらの 4 変異菌株の 1 つは 1 % サツカロースならびに 0.05 % 肉抽出物を追加し、0.01 % クエン酸、0.01 % コハク酸および 0.01 % グルタミン酸と共に実施例 1 の培地を用いた振盪培養で 15 時間培養し、同じ条件でその親菌株 24 N が産生する β -HB 量の 1.75 倍量を産生した。

拌器で攪拌し、次いで水 1 容量で希釈し、2 層の混合物となるようなだけジエチルエーテルを加える。有機層を水で十分に洗浄し、次いでエーテルを減圧で留去する。残渣はエゾイチゴのようになお D(-)-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを含有し、沸点 184~185℃/755mm、 $[\alpha]_D^{25} = -10.5^\circ$ （光学的に完全に純粋ではない。）。重量基準でこのエステル市販されて入手しうる DL-3-ヒドロキシ酪酸のエチルエステルよりも非常に強い芳香性を有する。

実施例 14

巨大菌 ATCC 32 菌株 CBS 38276 を用いた実施例 2 の発酵液の抽出液に同容量のエタノール、約 25 g の H_2SO_4 および 3 ml の濃 H_2SO_4 を加え、5 時間攪拌する。次いで反応混合物を大量の水で洗浄し、残った有機層を減圧で濃縮する。実施例 13 に記載したのと同じ性質の同じエステルが得られる。

実施例 15

エタノールの代りにメタノールを用いて実施例

実施例 12

家兎の約 500 g の平均体重の各 6 羽の 2 つのグループを大静脈カテーテル（ビナ・ジュグularis・ジュレマ（Vena jugularis julema））によつてのみ 6 ml/時間の注入速度で飼育した。対照グループの動物は 1 日 695 Kcal を含有する溶液、即ちペプチド + アミノ酸約 17 g (= 11 cal %)、炭水化物約 97 g (= 48 cal %) および脂肪約 34 g (= 41 cal %) ならびにミネラル物質およびビタミンで飼育した試験グループでは脂肪 20 重量%を D(-)-3-ヒドロキシ酪酸のナトリウム塩で置きかえた。10 日後、両グループの動物の平均体重増加は同じであつた。D(-)-3-ヒドロキシ酪酸の割合を注入液の脂肪成分の 30 重量%増加させると 5 日後、体重の増加は対照グループのそれと同じであつた。

実施例 13

飼育する D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 1 g をエタノール 100 ml に溶解し濃硫酸約 1 ml を得られた溶液に加える。反応混合物を室温で 3 時間磁気攪

拌し、次いで水 1 容量で希釈し、2 層の混合物となるようなだけジエチルエーテルを加える。有機層を水で十分に洗浄し、次いでエーテルを減圧で留去する。残渣はエゾイチゴのようになお D(-)-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを含有し、沸点 184~185℃/755mm、 $[\alpha]_D^{25} = -10.5^\circ$ （光学的に完全に純粋ではない。）。重量基準でこのエステル市販されて入手しうる DL-3-ヒドロキシ酪酸のエチルエステルよりも非常に強い芳香性を有する。

実施例 16

エチルアルコールの代りにプロピルアルコールを入れるという相異で、実施例 6 の発酵液を用いて実施例 14 と同様に行う。結果は実施例 15 と同様である。

実施例 17

エチルアルコールの代りにブチルアルコールを入れるという相異で、実施例 7 の発酵液を用いて実施例 14 と同様に行う。結果は実施例 15 と同様である。

実施例 18

エチルアルコールの代りにアミルアルコールを入れるという相異で、実施例 9 の発酵液を用いて実施例 14 と同様に行う。結果は実施例 15 と同様である。